

2.3 Probenvorbereitung biologischer Materialien

Für eine richtige und genaue Analyse biologischer Proben ist eine sorgfältige Probenvorbereitung erforderlich. Ziel einer jeden Probenvorbereitung ist es, das zu analysierende Material in eine der jeweiligen Analysenmethode zugänglichen Form zu überführen. Dies kann durch Zerstörung der Matrix mittels Aufschluß, Abtrennung des Analyten von störenden Begleitstoffen oder durch Aufkonzentrierung bzw. Anreicherung des Analyten erreicht werden.

Zur Probenvorbereitung biologischer Proben werden verschiedene Aufschlußtechniken eingesetzt, deren Nomenklatur sich im allgemeinen nach den äußeren Bedingungen des Aufschlußverfahrens richtet. So finden offene Naßaufschlüsse, Druckaufschlüsse, mikrowellenunterstützte Aufschlüsse und Trockenveraschungen Anwendung. Charakteristische Parameter eines Probenaufschlusses sind Aufschlußtemperatur und Aufschlußzeit, die Art und die Menge des Aufschlußreagenzes, sowie die Menge des eingesetzten Analysenmaterials.

2.3.1 Aufschlußtechniken

Das am häufigsten eingesetzte Verfahren ist der Naßaufschluß in sogenannten offenen Systemen unter Umgebungsdruck mit oxidierenden Säuren wie Salpetersäure (HNO_3), Schwefelsäure (H_2SO_4) oder Perchlorsäure (HClO_4), wobei letztere aufgrund ihrer erhöhten Reaktivität gegenüber organischen Materialien nur in binären oder ternären Gemischen mit anderen Mineralsäuren und nicht in geschlossenen Systemen eingesetzt wird [50]. Vorteile des Verfahrens sind zum einen hohe Probeneinwaagen und zum anderen eine leichte Automatisierbarkeit. Nachteile liegen in der Gefahr der Kontamination der Probe durch die Laborluft, dem hohen Reagenzienverbrauch und der Gefahr des Verlustes von Elementspuren.

Eine Verbesserung des Ergebnisses der Probenvorbereitung kann durch Arbeiten in geschlossenen Systemen durch die Verwendung von Autoklaven und Durchführung eines Druckaufschlusses erzielt werden. Gegenüber dem vorgenannten offenen Naßaufschluß bietet der Druckaufschluß einige Vorteile. Diese liegen in der weitgehend gegen die Laboratmosphäre abgeschirmten Arbeitsweise, durch die Kontaminationen verhindert werden können, in der Verkürzung der Aufschlußzeit durch Anwendung von Tem-

peraturen oberhalb des Siedepunktes des Aufschlußreagenzes, sowie einem geringeren Reagenzienbedarf. KREPPEL et al. belegten den Vorteil des geschlossenen (Druck-) Aufschlusses gegenüber dem offenen Aufschluß durch eine Analyse verschiedener biologischer Proben (Leber, Niere, Herz, Hirn, Haare) mit anschließender Bestimmung der Elementgehalte mittels ICP-OES [13]. Sie zeigten, daß für einige Elemente (As, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb und Zn) vergleichbare Gehalte wie beim Druckaufschluß erzielt werden konnten, sich nach dem offenem Aufschluß jedoch noch Rückstände (Fette) in den Aufschlußgefäßen befanden. Diese können den Ansaug- und Zerstäubungsvorgang in einem ICP-Spektrometer stören, weshalb die Methode des offenen Aufschlusses bei nachfolgender Messung am ICP als unzureichend beurteilt werden muß.

Um biologische Proben optimal aufzuschließen, ist nach WÜRFELS [50] eine *Temperatur* von 170 - 180 °C erforderlich. In seinen Arbeiten [50] - [57] zeigte er, daß durch eine Erhöhung der Aufschlußtemperatur über 180 °C keine nennenswerte Verbesserungen hinsichtlich des umgesetzten Kohlenstoffgehaltes erreicht werden kann. Die maximale Aufschlußtemperatur für Druckaufschlüsse wird zudem durch die Wahl des Gefäßmaterials begrenzt: Bei Verwendung von Aufschlußgefäßen aus Polytetrafluorethylen, PTFE (Teflon[®]), können je nach Qualität des Materials Temperaturen von 160 bis 200 °C eingestellt werden. Oberhalb von 200 °C beginnt PTFE zu erweichen. Zudem können Elemente bei zu hohen Temperaturen in die Gefäßwandungen hineindiffundieren und bei nachfolgenden Analysen Memoryeffekte auslösen. Als alternatives Gefäßmaterial wird Perfluor-Alkoxy (PFA) eingesetzt. Im Vergleich zu PTFE hat PFA den Vorteil einer höheren Temperaturstabilität (- 200 bis + 260 °C) und größeren Beständigkeit gegenüber den eingesetzten Mineralsäuren – ohne Diffusions- bzw. Memoryeffekte. Als Nachteil sind die weitaus höheren Materialkosten (ca. 80 - 100 DM/kg) anzuführen.

Die *Dauer* des Aufschlusses liegt nach JACKWERTH und WÜRFELS unabhängig von der Art des biologischen Materials bei 3 Stunden [54]. Eine Verlängerung führt zu keiner Verbesserung des Aufschlußresultates hinsichtlich der verbleibenden Menge an organischen Zersetzungsprodukten. Zu dieser Aufschlußzeit ist noch die vom Autoklavensystem abhängige Aufheizdauer zu addieren.

Die *Einwaagemenge* des biologischen Materials richtet sich nach dem Kohlenstoffgehalt der Probe, der Menge des Aufschlußreagenzes und dem maximal möglichen Innendruck, dem das Autoklavensystem standhalten kann. Unabhängig von der Art der biologischen Proben liegt der Druck in der Endphase des Aufschlusses bei ca. 2 MPa. Dieser Druck ergibt sich durch den Druck der entstehenden Gase CO₂ (aus dem Kohlenstoff der organischen Probenbestandteile) und NO/NO₂ (durch Reduktion der Salpetersäure), sowie durch den Dampfdruck des Wassers und der Salpetersäure.

Als Alternative zu dem doch relativ zeitaufwendigen Druckaufschluß hat sich seit Mitte der 80er Jahre der mikrowellenunterstützte Aufschluß etabliert. Aufgrund ihrer niedrigen Energie sind Mikrowellen nicht in der Lage, Molekülstrukturen zu ändern; sie können lediglich die Rotationen von Dipolen und die Molekularbewegung durch Ionenwanderung anregen, nicht jedoch Schwingungen oder Elektronenübergänge [53]. Der Zeitbedarf im Vergleich zu Systemen mit konventioneller Wärmeübertragung kann bei Verwendung der Aufschlußgeräte mit Mikrowellenanregung um einen Faktor 3 verkürzt werden [58]. So beträgt z.B. die Aufheizdauer für 10 mL konzentrierte Salpetersäure in Druckgefäßen auf eine Temperatur von ca. 180 °C bei einer Leistung von 700 Watt nur etwa 1 Minute.

Einige interessante Anwendungen, bei denen die Mikrowellentechnik als Methode der Probenvorbereitung angewendet wurde, sind z.B. die Analyse von Se in Rinderleber mit HNO₃ [59], die Bestimmung von Cd, Cu, Fe, Pb und Zn in Austern und Rinderleber [60], oder die Analyse mariner Proben mit einem Gemisch aus HNO₃/HF [61] bzw. HNO₃/HClO₄ [61], [62]. Auch Vollblut und Blutserum wurden nach mikrowellenunterstütztem Aufschluß analysiert und die Elemente P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Rb Sr und Pb bestimmt [43]. Die Elementgehalte der Probenlösungen aller zuvor genannten Beispiele wurden mit Hilfe spektroskopischer Methoden bestimmt.

2.3.2 Suspensions- und Gefrierschnitt-Technik

Zwei weitere Möglichkeiten der Probenpräparation, die im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Aufschlußtechniken einen Vorteil hinsichtlich des Zeitaufwandes für die Probenvorbereitung haben, sind die Suspensions- und die Gefrierschnitt-Technik. Beide Methoden sind insbesondere für die Bestimmung von Elementgehalten mit Hilfe der TRFA geeignet, da sie die für die TRFA maßgebliche Anforderung einer dünnen Probenschicht erfüllen.

Bei der *Suspensionstechnik* wird das Probenmaterial homogenisiert und das Homogenisat (Einwaagemenge bis zu 50 mg; Partikelgröße $\leq 10 \mu\text{m}$) mit 50 - 300 μL Ethanol gemischt. Nach Zugabe eines internen Standards, sowie Auftragung und Trocknung eines aliquoten Teils der Probensuspension befindet sich etwa 10 bis 100 μg des Probenmaterials auf dem SiO_2 -Träger, der dann mit Hilfe des TRF-Spektrometers direkt analysiert werden kann [63] - [65].

Bei der *Gefrierschnitttechnik* werden mit Hilfe eines Mikrotoms aus gefrorenen Gewebeproben – je nach Beschaffenheit des biologischen Materials – 2 bis 30 μm dünne Schnitte angefertigt, die auf SiO_2 -Probenträgern aufgebracht und ebenfalls mit einem internen Standard versetzt werden. Nach der Trocknung findet die Elementbestimmung mit Hilfe des TRF-Spektrometers statt [46], [66] - [68].

Die für die Suspensions- bzw. Gefrierschnitt-Technik erforderlichen Probenmengen sind im Vergleich zu den für die bereits beschriebenen Aufschlußverfahren notwendigen Probeneinwaagen sehr gering. Hierin kann einerseits ein Vorteil liegen – wenn z.B. insgesamt nur eine geringe Menge eines biologischen Materials zur Verfügung steht – andererseits aber auch ein Nachteil. Letzterer liegt darin, daß bei der Bestimmung von Elementen, welche im ng/kg-Bereich in den Proben vorliegen, diese vielfach unterhalb der Nachweisgrenze liegen und so nicht mehr mittels TRFA nachgewiesen werden können. Ein weiteres Problem kann in der Inhomogenität der Probe liegen.